



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

---

Actividad antimicrobiana de extractos enológicos y vino sobre los  
patógenos periodontales *Porphyromonas gingivalis*,  
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium*  
*nucleatum* incluidos en un modelo de biopelícula oral *in vitro*.

---

Jaime Bueno de Vicente

Tutor: David Herrera González

Curso 2016-2017

# Índice

<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
OBJETIVOS .....	3
MATERIALES Y MÉTODOS .....	3
SIGNIFICACIÓN .....	4
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
CEPAS UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	12
CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS .....	13
FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA .....	15
PRODUCTOS UTILIZADOS .....	17
EXPOSICIÓN DE LA BIOPELÍCULA A LAS SOLUCIONES Y LOS EXTRACTOS ENOLÓGICOS .....	19
TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS .....	20
ANÁLISIS DE BIOPELÍCULAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER (CLSM) .....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
EFECTOS ANTIMICROBIANOS DEL VINO TINTO (DESALCOHOLIZADO O NO) SOBRE LA BIOPELÍCULA .....	26
EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE LOS EXTRACTOS ENOLÓGICOS PROVINOLS™ Y VITAFLAVAN® SOBRE LA BIOPELÍCULA .....	31
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>45</b>

# Resumen

## Objetivos

Investigaciones anteriores avalan la capacidad antimicrobiana de los polifenoles frente a diversos patógenos, sin embargo, la evidencia disponible sobre la eficacia de su efecto contra los patógenos periodontales es aún escasa. Dado que las bacterias se organizan en biopelículas en la cavidad oral, el objetivo de este estudio es analizar la capacidad antimicrobiana del vino y de diferentes extractos enológicos sobre los patógenos periodontales *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, y en el recuento total de bacterias incluidas en un modelo de biopelícula oral *in vitro*.

## Materiales y métodos

Se utilizó un modelo *in vitro* estático de biopelícula, que incluye seis especies bacterianas implicadas en el desarrollo de la biopelícula oral subgingival *in vivo*, representando colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y colonizadores tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*). Las biopelículas se formaron sobre discos estériles de hidroxiapatita, en placas de cultivo. Tras 72 h de incubación, se expusieron las biopelículas por inmersión durante 1 y 5 minutos a las soluciones de vino (desalcoholizado o no) y durante 30 segundos y 1 minuto a los extractos enológicos Provinols<sup>TM</sup> y Vitaflavan<sup>®</sup>. Se usaron como controles, tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), Dimetilsulfóxido (DMSO) al 4% y Etanol (EtOH) al 12%. El recuento de las bacterias vivas antes y después del tratamiento, expresadas como unidades formadoras de colonias por

mililitro (UFC/mL), se evaluaron mediante la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) combinada con Propidio de MonoAzida (PMA).

## Resultados

El vino tinto y el vino tinto desalcoholizado, causaron una reducción estadísticamente significativa en el recuento de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y en el recuento total de las bacterias incluidas en una biopelícula multi-especie, generada *in vitro* después de 5 minutos de exposición. Solamente *P. gingivalis* sufrió una reducción de la vitalidad después de 1 minuto de tratamiento tanto con el vino tinto como con la solución desalcoholizada. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y en el número total de bacterias de la biopelícula después de la exposición de 30 segundos y 1 minuto ante los extractos Provinols™ y Vitaflavan®, con un efecto menor sobre *P. gingivalis*.

## Significación

Los resultados proporcionan evidencia de que el vino tinto (desalcoholizado o no) y los extractos enológicos utilizados en el estudio (Provinols™ y Vitaflavan®) tienen efecto para de reducir la carga total bacteriana, sugiriendo que los patógenos periodontales *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* son susceptibles a la acción de los mismos.

## Introducción

Las enfermedades periodontales se encuentran entre las enfermedades más prevalentes en el ser humano (White y cols., 2012), siendo las bacterias organizadas en biopelículas el agente etiológico primario de las mismas (Socransky y Haffajee 2002; 2005; Davey y Costerton 2006; Marsh 1994; 2005).

La cavidad oral promueve un ambiente favorable para la colonización y el crecimiento de una gran variedad de microorganismos (Aas y cols. 2005) debido a las condiciones que esta ofrece, tales como la humedad, la temperatura, la existencia de superficies duras o la gran cantidad de nutrientes; incluyendo diversos organismos como virus, micoplasmas, bacterias, arqueas, hongos o protozoos (Marsh y Martin 2009). En un estado de salud oral, encontramos una biopelícula tolerada por el hospedador, sin embargo, debido a un proceso de disbiosis (Hill y Artis 2010), en las enfermedades periodontales, tales como gingivitis o periodontitis, las biopelículas aumentan en volumen y complejidad, con una mayor proporción de bacterias Gram-negativas y reconocidos patógenos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* o *Treponema denticola* y mayores niveles de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; esta última más comúnmente en pacientes con periodontitis agresiva (Teles y cols. 2013).

El concepto de la especificidad bacteriana en las enfermedades periodontales ha sido ampliamente aceptado por muchos autores (Socransky y cols. 1998; Papapanou y cols. 2002; Socransky y Haffajee 2005). Sin embargo, son necesarios otros factores para el establecimiento de la periodontitis, como la susceptibilidad del individuo o la presencia de

factores ambientales de riesgo para el establecimiento y el desarrollo de la enfermedad (Page y Kornman 1997). Por ello, las enfermedades periodontales son tratadas con la eliminación de las biopelículas subgingivales y el posterior control de las supragingivales, mediante una meticulosa higiene siendo el propósito de estos tratamientos el control de las bacterias patógenas en las bolsas periodontales (Van der Weijden y Timmerman 2002; Cobb 2002).

Este objetivo puede ser conseguido con una instrumentación mecánica no quirúrgica (Cobb 2002) o quirúrgica (Heitz-Mayfield y cols. 2002). A pesar de ello, conseguir una reducción de los patógenos periodontales con el tratamiento mecánico de la enfermedad es difícil de conseguir (Mombelli y cols. 1994; 2000). Además, estos patógenos tienen las características de invadir otros nichos orales, como la lengua, las amígdalas o las mucosas, produciendo una futura recolonización de las localizaciones tratadas (Beikler y cols. 2004; Sachdeo y cols. 2008; Quirynen y Van Assche 2011). Ante ello surge la posibilidad de añadir al tratamiento agentes antimicrobianos locales o sistémicos, aunque solo parecen tener un éxito parcial (Herrera y cols. 2008; 2012; Sanz y cols. 2012; Matesanz-Pérez y cols. 2013). Además, surgen problemas relacionados al uso de algunos agentes antimicrobianos como el desarrollo de resistencias bacterianas, sumado al desarrollo de efectos nocivos gastrointestinales, renales o hepáticos derivados del uso de antibióticos (Hersh y Moore 2008). También la utilización de antisépticos, puede causar irritación de las mucosas, tinción dental o la formación más rápida de cálculo dental entre otros efectos (Serrano y cols. 2015). Estos hechos nos llevan al desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y el manejo de las enfermedades periodontales de una forma más eficiente y segura (Mah y O'Toole 2001; Strydom y cols. 2012; van Winkelhoff 2012; Rams y cols. 2014).

En los últimos años, el uso de productos naturales, tales como compuestos polifenólicos, para el tratamiento y la prevención de estas enfermedades han mostrado efectos positivos.

Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales en animales, soportan el papel de los polifenoles como posibles agentes para la prevención de varias enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, metabólicas, neurodegenerativas y algunos cánceres (Middleton y cols. 2000; Arts y Hollman 2005; Graf y cols. 2005; Pandey y Rizvi 2009; Mitjavila y Moreno 2012). Además, estos compuestos han ganado interés por su posible uso potencial para la prevención y el tratamiento de caries y las enfermedades periodontales (Palaska y cols. 2013).

Los polifenoles son compuestos naturales que pueden ser encontrados en plantas, como frutas (uva, pera, manzana o cereza,) cereales, vegetales secos, chocolates y también en bebidas (vino tinto, blanco, té negro, verde o cistus) (Beecher 2003).

Muchos estudios han reflejado actividades inhibitorias de ciertos agentes polifenólicos extraídos de arándanos, hojas de loto, algas o semillas de perilla contra un amplio rango de bacterias orales, principalmente relacionadas con la caries dental (Sakanaka y cols. 1996; Hirasawa y cols. 2002; Yamamoto y Ogawa 2002; Bakri y Douglas 2005; Percival y cols. 2006; Furiga y cols. 2008; Kang y cols. 2008; Li y Xu 2008; Tsui y cols 2008; Xie y cols. 2008; Sampaio y cols. 2009; Geoghegan y cols. 2010; La y cols. 2010; Badet y Quero 2011; Choi y cols. 2012; Furiga y cols. 2014).

Con respecto a los patógenos periodontales, Li y colaboradores (2008) y Geoghegan y colaboradores (2010) encontraron actividad antimicrobiana de la quecetina contra *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* entre otras bacterias. Por otro lado, se ha encontrado una fuerte actividad antimicrobiana de ciertos polifenoles derivados de extractos de semillas de perilla y té verde, contra *P. gingivalis* y *Prevotella intermedia* (Hirasawa y cols. 2012; Yamamoto y Ogawa 2002). Tsui y colaboradores (2008) demostraron que la naringina, un componente flavonoide que es comúnmente encontrado

en el pomelo, tiene capacidad antimicrobiana ante *A. actinomycetemcomitans*; y Bakri y colaboradores (Bakri y Douglas 2005) observaron que *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* eran susceptibles a la acción de la alicina, encontrado en el extracto de ajo. También, Yamanaka y colaboradores (Yamanaka y cols. 2007) estudiaron el efecto inhibitorio del polifenol del arándano en la formación de la biopelícula y su efecto en las proteasas cisteínicas de la *P. gingivalis*.

Respecto a los extractos enológicos, los estudios previos describen que los extractos del vino tinto y la uva pueden inhibir el desarrollo de diferentes cepas de *Streptococcus* spp. y otras bacterias asociadas a la caries dental (Daglia y cols. 2007; Thimothe y cols. 2007; Furiga y cols. 2008; 2014). También se ha investigado el efecto de los enjuagues orales con diferentes polifenoles derivados de bebidas (incluyendo distintos tipos de té y vino) en bacterias adheridas a la cavidad oral y en la inhibición del crecimiento de patógenos orales (Hannig y cols. 2009). En un estudio reciente, igualmente se mostró que a partir de extractos de pasas se podía inhibir el crecimiento de patógenos orales (Wu y cols. 2009). También Muñoz-González y colaboradores (Muñoz-González y cols. 2014) encontraron que el vino tinto, y sus componentes, tienen capacidad antimicrobiana contra la microbiota oral usando modelos de biopelículas generadas *in vitro*, incluyendo *Actinomyces oris*, *F. nucleatum*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* y *Veillonella dispar*.

Sin embargo, muy pocos estudios han descrito los efectos de los extractos naturales en modelos *in vitro* con múltiples especies en la biopelícula, y aún más escasa son las investigaciones acerca del papel de los extractos del vino y de la semilla de la uva en patógenos periodontales incluidos en una biopelícula oral (Yamanaka y cols. 2007; Furiga y cols. 2008; Xie y cols. 2008; Sampaio y cols. 2009; Badet y Quero 2011; Furiga y cols. 2014; Muñoz-González y cols. 2014).



Dado que los patógenos periodontales en la placa dental se encuentran organizados estructural y funcionalmente en biopelículas, el objetivo de este estudio ha sido evaluar la capacidad antimicrobiana del vino tinto y del vino tinto desalcoholizado frente los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*, así como en el total de las bacterias, incluidos en un modelo de biopelícula formada *in vitro*. También se estudió el efecto antimicrobiano del extracto enológico Provinols™, especialmente rico en antocianinas, y el extracto enológico de semillas de uva Vitaflavan®.

# Hipótesis

El vino tinto, el vino tinto desalcoholizado y los extractos polifenólicos del vino (Provinols™) y de las semillas de la uva (Vitaflavan®) tienen capacidad antimicrobiana frente a los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*, así como en el número total de las bacterias incluidas en un modelo de biopelícula oral formada *in vitro*.

## Objetivos

### Objetivos generales

- Estudiar la capacidad antimicrobiana del vino tinto alcoholizado y desalcoholizado y los extractos enológicos Provinols™ y Vitaflavan® sobre los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *A. actinomycentemcomitans*, *F. nucleatum* y en el recuento total de las bacterias, en un modelo de biopelícula oral generada *in vitro*, utilizando como unidad de medida el número de unidades formadoras de colonia por mililitro de células vivas presentes (UFC/mL).

### Objetivos específicos

- Analizar las diferencias en la reducción del número de bacterias expresadas como UFC/mL, dependiendo del tiempo de exposición del vino tinto (desalcoholizado o no) de 1 y 5 minutos, sobre la biopelícula oral generada *in vitro*.
- Investigar las diferencias en la reducción del número de bacterias, utilizando como unidad de medida las UFC/mL, en relación al tiempo de exposición de los extractos

enológicos (Provinols<sup>TM</sup> y Vitaflavan<sup>®</sup>) de 30 segundos y 1 minuto, sobre la biopelícula oral generada *in vitro*.

## Materiales y Métodos

### Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Para llevar a cabo la realización del experimento es necesario la formación de una biopelícula *in vitro*. Se siguió el método utilizado por Sánchez y colaboradores (2011) seleccionando las bacterias que representan colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y colonizadores tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cepas seleccionadas y colección de cultivo

Cepa	Referencia
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSMZ <sup>1</sup> 20482
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ 8324
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC <sup>2</sup> 11810
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC <sup>3</sup> 19039
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT <sup>4</sup> 907T

<sup>1</sup>DMS, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen

<sup>2</sup>NCTC, National Collection of Type Cultures

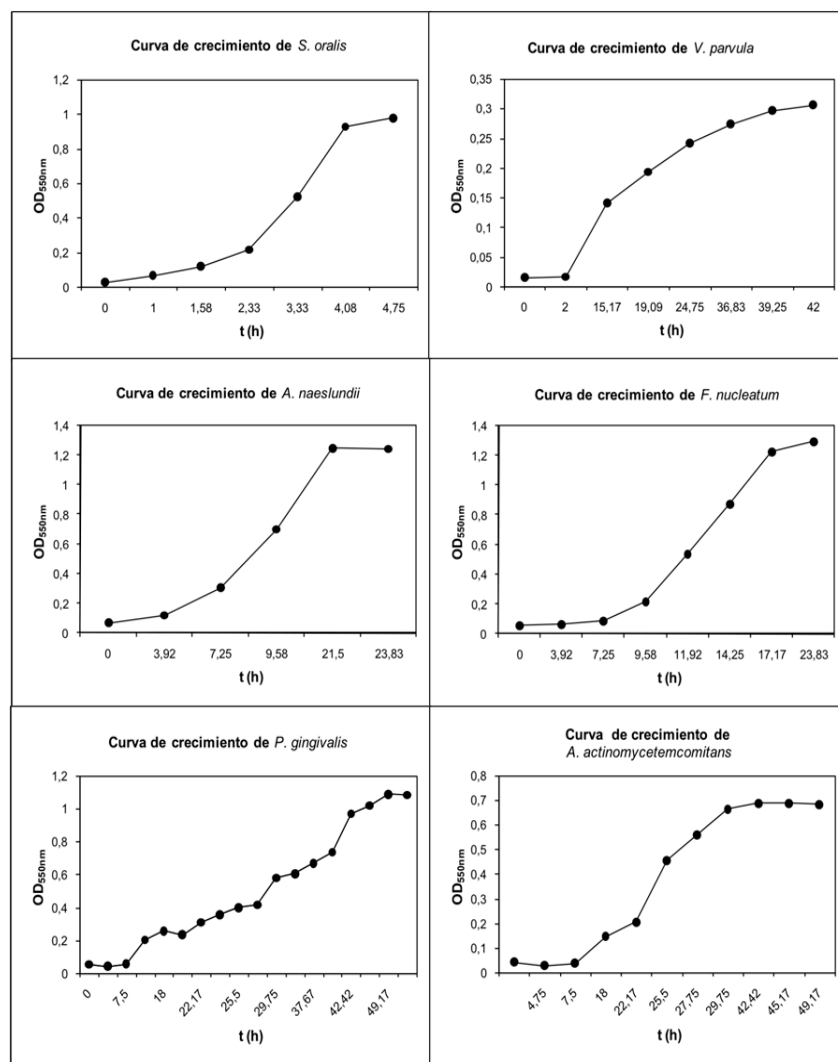
<sup>3</sup>ATCC, American Type Cultures Collection

<sup>4</sup>CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

Las bacterias fueron cultivadas en placas con medio Agar Sangre (Oxoid nº2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), suplementado con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L), en condiciones de anaerobiosis (10% H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en equilibrio) a 37°C entre 24- 72h.

#### Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas

Para conseguir unas condiciones estandarizadas en el estudio, inoculando una concentración constante de cada una de las cepas en los distintos ensayos, consiguiendo así una reproducibilidad del modelo, se emplearon las curvas de crecimiento de cada bacteria que fueron realizadas anteriormente para el desarrollo de un modelo de biopelícula estática (Sánchez y cols. 2011) (Figura 1).



**Figura 1.** Curvas de crecimiento de los microorganismos utilizados en el modelo *in vitro* de biopelícula oral (Sánchez y cols. 2011).

### Formación de la biopelícula

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento, se procedió a la formación de la biopelícula sobre los discos estériles de hidroxapatita (HA) de 7 mm de diámetro y 1,8 mm de grosor (DS 0,2 mm; Clark-son Chromatography Products, Williamsport, PA, EE.UU.).

Una colonia de cada cultivo aislado se inoculó en 15 mL de medio BHI (Brain-Heart infusion) modificado [Infusión cerebro-corazón (Becton, Dickinson and Company; Becton, Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). suplementada con 2,5 g/L de mucina (Oxoid), 1,0 g/L de extracto de levadura (Oxoid), 0,1 g/L de cisteína (Sigma), 2,0 g/L de bicarbonato de sodio (Merck), 5,0 mg/mL de hemina (Sigma), 1,0 mg/mL de menadiona (Merck) y 0,25% (v/v) de ácido glutámico (Sigma)]. Este inóculo se incubó en anaerobiosis a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento en cada una de las cepas utilizadas. Para saber en qué fase se encontraba el crecimiento bacteriano, se utilizó un espectrofotómetro midiendo la densidad óptica (D.O.) a 550 nm (Figura 2).



**Figura 2.** Espectrofotómetro. Laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid

A continuación, se preparó un preinóculo mixto con las 6 especies bacterianas seleccionadas a la concentración ajustada por espectrofotometría en un medio de cultivo BHI modificado (Sánchez y cols. 2011) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cepas seleccionadas y concentración final en el preinóculo

Cepa	Concentración final (UFC/mL)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10 <sup>6</sup>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10 <sup>6</sup>
<i>Veillonella parvula</i>	10 <sup>5</sup>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10 <sup>5</sup>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10 <sup>6</sup>
<i>Streptococcus oralis</i>	10 <sup>3</sup>

\* UFC/mL : Unidades formadoras de colonias por mililitro

Los discos de HA se introdujeron en una placa multipocillo estéril de 24 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania), vertiendo 1,5 mL del preinóculo mixto. Además, se utilizó como control del proceso el medio de cultivo BHI modificado sin inocular, para confirmar la esterilidad del medio y la correcta manipulación e incubación.

Una vez realizado este proceso, se incubó dichos preinóculos junto con los discos de HA en un ambiente de anaerobiosis (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>) a 37°C durante 72 horas.

Finalmente, transcurrido este tiempo, se retiraron los discos del medio de cultivo con la biopelícula ya formada, en condiciones de esterilidad, para su posterior tratamiento con el vino y los extractos enológicos.



## Productos utilizados

### ***Vino tinto***

El vino utilizado en este estudio fue un vino tinto joven (var. Pinot Noir, vintage 2010), proporcionado por Bodegas Miguel Torres S.A. (Vilafranca del Penedès, Barcelona, España). El vino fue elaborado según procedimientos vinícolas propios de la bodega y fue seleccionado debido a su relativamente alto contenido fenólico: Polifenoles totales = 1,758 mg de ácido gálico equiv/L, Antiocianinas = 447 mg de malvidin-3-glucósido/L, y catequinas totales = 1,612 mg de (+)-catequina/L (Tabla 3). El principal compuesto fenólico encontrado en este vino incluye antocianinas, flavan-3-oles, flavonoles, alcoholes, estilbenos y ácidos hidroxycinámicos (Muñoz-González y cols. 2013).

Para la preparación del vino tinto desalcoholizado, el etanol se quitó usando un evaporador rotatorio y después se añadió agua destilada hasta conseguir el volumen original.

### ***Extractos enológicos***

El extracto de vino, Provinols<sup>TM</sup>, fue provisto por Safic-Alcan Especialidades S.A.U. (Barcelona, España). El extracto de semilla de uva, Vitaflavan®, fue administrado por Piriou (Les Derives Resiniques & Terpeniques S.A., Francia). El contenido fenólico total del extracto Provinols<sup>TM</sup> fue de 474 mg de ácido gálico equiv/g y de 629 mg de ácido gálico equiv/g para Vitaflavan®.

El extracto de vino y de semilla de uva fue disuelto en agua destilada con 4,0% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (v/v), a una concentración de 20 g/L.

**Tabla 3.** Componentes fenólicos del vino y sus extractos. Reproducido del artículo de Muñoz-González, I., y cols. (2014).

	Wine (mg/L) (Muñoz-González et. al., 2013)	Wine extract (mg/g) (Sánchez-Patán et al., 2012)	Grape seed extract (mg/g) (Sánchez-Patán et al., 2011)
<b>Benzoic acids</b>			
Gallic acid	27.3±0.2	1.06 ± 0.05	9.11 ± 0.01
Protocatechuic acid	3.88±0.01	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
3-O-Methylgallic acid	1.06±0.06	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
4-Hydroxybenzoic acid	0.570±0.008	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Vanillic acid	1.85±0.03	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Syringic acid	2.30±0.13	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Benzoic acid	1.14±0.06	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Salicylic acid	0.215±0.001	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
<b>Phenols</b>			
Phloroglucinol	0.326±0.030	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Tyrosol	31.4±1.4	18.9 ± 1.3	<i>n.a.</i>
Dihidroxiphenylpropan-2-ol	0.303±0.045	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
<b>Cinnamic acids</b>			
Caffeic acid	6.97±0.26	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
p-Coumaric acid	1.39±0.02	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Ferulic acid	0.217±0.018	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Coutaric acid	8.64±0.01	2.00 ± 0.12	<i>n.a.</i>
Caftaric acid	4.98±0.33	0.192 ± 0.071	<i>n.a.</i>
<b>Stilbenes</b>			
Resveratrol	7.12±0.29	0.427 ± 0.020	<i>n.a.</i>
Resveratrol-3-Oglucoside	<i>n.a.</i>	9.17 ± 0.17	<i>n.a.</i>
<b>Flavan-3-ols and others</b>			
(+)-Catechin	51.6±1.7	9.90 ± 0.32	74.6 ± 0.09
(-)-Epicatechin	34.9±2.9	6.87 ± 0.15	67.7 ± 0.75
(-)-Epicatechin-3-O-gallate	<i>n.a.</i>	0.226 ± 0.018	26.2 ± 0.41
Procyanidin B1	79.1±0.9	11.1 ± 0.1	61.0 ± 1.42
Procyanidin B2	44.7±0.6	4.69 ± 0.10	45.1 ± 0.95
B2-3-O-gallate	<i>n.a.</i>	0.0271 ± 0.0106	1.80 ± 0.06
B2-3'-O-gallate	<i>n.a.</i>	0.0258 ± 0.0028	1.61 ± 0.01
Procyanidin B3	16.0±1.0	1.23 ± 0.02	20.4 ± 0.33
Procyanidin B4	12.9±0.3	0.827 ± 0.018	15.0 ± 0.13
Procyanidin B5	2.67±0.01	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Procyanidin B7	5.75±0.15	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Procyanidin C1	14.0±0.4	1.07 ± 0.04	7.07 ± 0.08
Other trimers	7.96±1.05	1.24 ± 0.09	6.81 ± 0.06 (t2)
<b>Flavonols</b>			
Quercetin	1.92±0.01	22.4 ± 0.6	<i>n.a.</i>
Myricetin	0.697±0.028	2.55 ± 0.07	<i>n.a.</i>
Kaempferol	<i>n.d.</i>	0.0366 ± 0.0055	<i>n.a.</i>
Quercetin-3-O-glucoside	<i>n.a.</i>	0.137 ± 0.023	<i>n.a.</i>
Quercetin-3-O-galactoside	<i>n.a.</i>	0.107 ± 0.006	<i>n.a.</i>
<b>Anthocyanins</b>			
Delphinidin-3-O-glucoside	2.58±0.11	0.568 ± 0.012	<i>n.a.</i>
Cyanidin-3-O-glucoside	0.761±0.041	0.265 ± 0.010	<i>n.a.</i>
Petunidin-3-O-glucoside	4.06±0.13	1.47 ± 0.03	<i>n.a.</i>
Peonidin-3-O-glucoside	18.9±2.0	1.78 ± 0.01	<i>n.a.</i>
Malvidin-3-O-glucoside	36.7±3.4	9.01 ± 0.50	<i>n.a.</i>

### Exposición de la biopelícula a las soluciones y los extractos enológicos

La capacidad antimicrobiana fue evaluada por la reducción en el número de UFC/ml usando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Se utilizaron dos protocolos diferentes:

- Para el vino tinto (desalcoholizado o no), las biopelículas cultivadas durante 72 horas, fueron sumergidas durante 1 y 5 minutos en las soluciones del vino a temperatura ambiente, y en una solución salina tampón (PBS) y etanol al 12% como controles. El tiempo de exposición viene determinado por la composición en principios activos del producto (en este caso inferior a la de los extractos que se usan en el mismo estudio). El control positivo de etanol al 12% se incluye, por su posible efecto antimicrobiano, al estar presente en el caso del vino tinto a un porcentaje similar.
- Para los extractos enológicos Provinols™ y Vitaflavan®, las biopelículas cultivadas durante 72 horas fueron sumergidas durante 30 segundos y 1 minuto en las soluciones de estos extractos a temperatura ambiente, y en PBS y DMSO al 4% como controles. El tiempo de exposición viene determinado por la composición en principios activos del producto (en este caso superior a la de los vinos que se usan en el mismo estudio). El control negativo de DMSO al 4% se incluye, por su posible efecto antimicrobiano, al ser el solvente necesario para solubilizar los extractos.

Este procedimiento se realizó 3 veces en diferentes días, usando nuevos cultivos bacterianos.

## Tratamiento de las muestras microbiológicas

Después de la exposición, las biopelículas fueron lavadas en 2 mL de PBS estéril (inmersión de 10 segundos por lavado), en tres ocasiones, para quitar cualquier remanente de la solución enológica. A continuación, las biopelículas fueron desprendidas de los discos de HA mediante un procedimiento de vorteadado (utilizando vortex) durante 2 min en 1 mL de PBS. Para discriminar entre el ADN de las bacterias vivas y muertas, se utilizó Propidio de MonoAzida (PMA) (Biotium Inc., Hayward, CA, EE.UU.). El uso de esta sustancia ha mostrado la habilidad de distinguir por qPCR entre bacterias vivas e irreversiblemente dañadas, impidiendo la replicación de estas últimas, y por tanto detectándose solo las bacterias vitales cuando se combina con qPCR (Sánchez y cols. 2014). El PMA se añadió a los tubos de la muestra que contenían 250  $\mu$ L de células de la biopelícula disgregada, con una concentración final de 100  $\mu$ M. A continuación, se expuso a una incubación por un periodo de 10 minutos a 4°C en la oscuridad. Finalmente, la muestra fue sometida a 30 minutos de exposición lumínica usando el dispositivo PMA-Lite LED Photolysis (Biotium Inc.). Después de la reacción cruzada foto-inducida del PMA y el ADN, las células fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 3 minutos, antes de proceder a aislar el ADN. Para controlar cualquier posible influencia del proceso sobre la viabilidad bacteriana, el mismo proceso se realizó (incubación a 4°C y administración de la luz) pero sin la exposición a PMA, siendo usado este procedimiento como control negativo.

El ADN bacteriano fue después aislado de todas las biopelículas usando el kit comercial ATP Genomic DNA Mini Kit® (ATP biotech. Taipei, Taiwán), siguiendo las instrucciones del fabricante y se realizó la hidrólisis mediante sondas por qPCR, siendo el método de elección para detectar y cuantificar material genético. La amplificación de la qPCR fue realizada según el protocolo previamente optimizado, utilizando cebadores [sintetizados por Life

Technologies Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos)] y sondas [sintetizados por Life Technologies Invitrogen y Roche (Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania)] con afinidad a genes 16S rRNA (Sánchez y cols. 2014) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Secuencias de los cebadores y sondas usados para la detección y cuantificación del ADN genómico de las bacterias involucradas en el desarrollo de la biopelícula. Tanto los cebadores como las sondas, en todos los casos, se han dirigido al gen 16S *rRNA*.

Bacteria	Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Referencia
<b>Pg</b> <b>Avance</b> <b>Reverso</b> <b>Sonda</b>	GCGCTCAACGTTTCAGCC CACGAATTCCGCCTGC 6FAM-CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA	67	(Boutaga y cols. 2003)
<b>Aa</b> <b>Avance</b> <b>Reverso</b> <b>Sonda</b>	GAACCTTAC CTACTCTTGACATCCGAA TGCAGCACCTGTCTCAAAGC 6FAM-AGAACTCAGAGATGGGTTTGTGCCTTAGGG-TAMRA	80	(Boutaga y cols. 2005)
<b>Fn</b> <b>Avance</b> <b>Reverso</b> <b>Sonda</b>	GGATTTATTGGGCGTAAAGC GGCATTCTACAAATATCTACGAA 6FAM-CTCTACACTTGTAGTTCCG-TAMRA	162	(Boutaga y cols. 2005)
<b>Bacterias totales</b> <b>Avance</b> <b>Reverso</b> <b>Sonda</b>	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 6FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-TAMRA	466	(Nadkarni y cols. 2002)

pb = pares de bases; Clave especies: Pg (*P. gingivalis*), Aa (*A. actinomycetemcomitans*), Fn (*F. nucleatum*).

La reacción se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l, que contiene: 10  $\mu$ l de 2x *master mixture* (LC 480 Probes Master; Roche), la concentración óptima de cebadores y sonda (300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 y 300 nM, para *P. gingivalis*; 600, 600 y 300 nM para *F. nucleatum* y 350, 350 y 100 nM para las bacterias totales), y 5  $\mu$ l de ADN de las muestras de la biopelícula. Las muestras fueron sometidas a un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 10 min, seguidos de 45 ciclos a 95°C durante 15 seg y 60°C durante 1 min. Los análisis se llevaron a cabo con el equipo LightCycler® 480 II thermocycler (Roche). Las placas usadas en el estudio han sido FramStar 480 (4titude); The North Barn; Dampthurst Lane, Inglaterra, selladas con QPCR Adhesive Clear Seals (4titude).

Cada muestra de ADN fue analizada por duplicado. El valor del ciclo de cuantificación (Cq), anteriormente conocido como el valor umbral del ciclo (Ct), describiendo el ciclo de la PCR en el cual la fluorescencia sobrepasa al estado basal, fue determinado usando el paquete informático (LC 480 Software 1,5; Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania). La cuantificación del número de células vivas detectadas por qPCR estuvo basada en curvas estándares. Para ello, un mL de cada una de las seis especies utilizada en el estudio, a una concentración de  $10^9$  UFC/mL, fueron sometidas al método de extracción de ADN anteriormente mencionado. Se realizaron diluciones seriadas de cada ADN de las distintas bacterias en agua estéril, con un rango de  $10^9$ - $10^0$  UFC/mL. Las curvas estándares fueron construidas con los valores Cq generados en la qPCR frente al log de UFC/mL. La correlación entre los valores Cq y las UFC/mL fue generado automáticamente a través del software (LC 480 Software 1,5; Roche).

Todos los ensayos fueron desarrollados con un rango lineal de detección establecido por la pendiente de 3,3-3,6 ciclos/log,  $r^2 > 0,997$  y un rango de eficiencia de 1,9-2,0. Se establecieron medidas para evitar la contaminación de ADN. A pesar de ello, cuando el

control negativo (NTC) daba lugar a lecturas de replicación de ADN, el límite de detección era establecido en el último valor de la curva estándar con una diferencia de cinco ciclos con respecto al control negativo.

#### Análisis de biopelículas por Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)

Después del tratamiento antimicrobiano, y antes de la microscopía confocal de barrido láser, los discos con las biopelículas fueron subsecuentemente lavados en 2 mL de PBS estéril (inmersión de 10 segundos por lavado) en tres ocasiones, para retirar las bacterias no adheridas. La imagen de microscopía confocal no invasiva, en biopelículas hidratadas, fue llevada a cabo usando el microscopio Ix83 Olympus de fase fija acoplado a un sistema confocal Olympus FV1200 (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japón). Los especímenes fueron teñidos con el kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit solution (Molecular Probes B. V., Leiden, Holanda) a temperatura ambiente. Se utilizó la relación de fluorocromo 1: 1 con un tiempo de tinción de  $9 \pm 1$  min para obtener la señal óptima de fluorescencia a las longitudes de onda correspondientes (Syto9: 515-530 nm, yoduro de propidio (IP):  $> 600$  nm). Se seleccionaron al menos tres localizaciones separadas y representativas en los discos cubiertos con biopelícula para realizar las mediciones. El software CLSM fue ajustado para tomar una serie de exploraciones de 1  $\mu\text{m}$  de espesor (8 bits, 1024x1024 píxeles). Las imágenes se analizaron utilizando el software Olympus® (Olympus).

#### Análisis estadístico

La variable dependiente primaria usada en este estudio ha sido el número de bacterias vitales presentes en la biopelícula, formada *in vitro*, sobre los discos de HA y medido como UFC/mL de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, así como el número total de bacterias. Se realizó un análisis para cada ensayo del estudio (n=9). Los datos se



sometieron al test de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad del conjunto de datos. Los datos fueron expresados como medias, con desviaciones estándar (DS). Se realizó un modelo lineal generalizado para comparar los efectos de cada una de las soluciones y su interacción con la principal variable dependiente (UFC/mL), para cada bacteria (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*) y el total de bacterias, usando el método de máxima verosimilitud y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una  $p < 0,05$ . El paquete informático (IBM SPSS Statistics 21,0; IBM Corporation, Armonk, NY, EEUU) fue utilizado para el análisis de los datos.

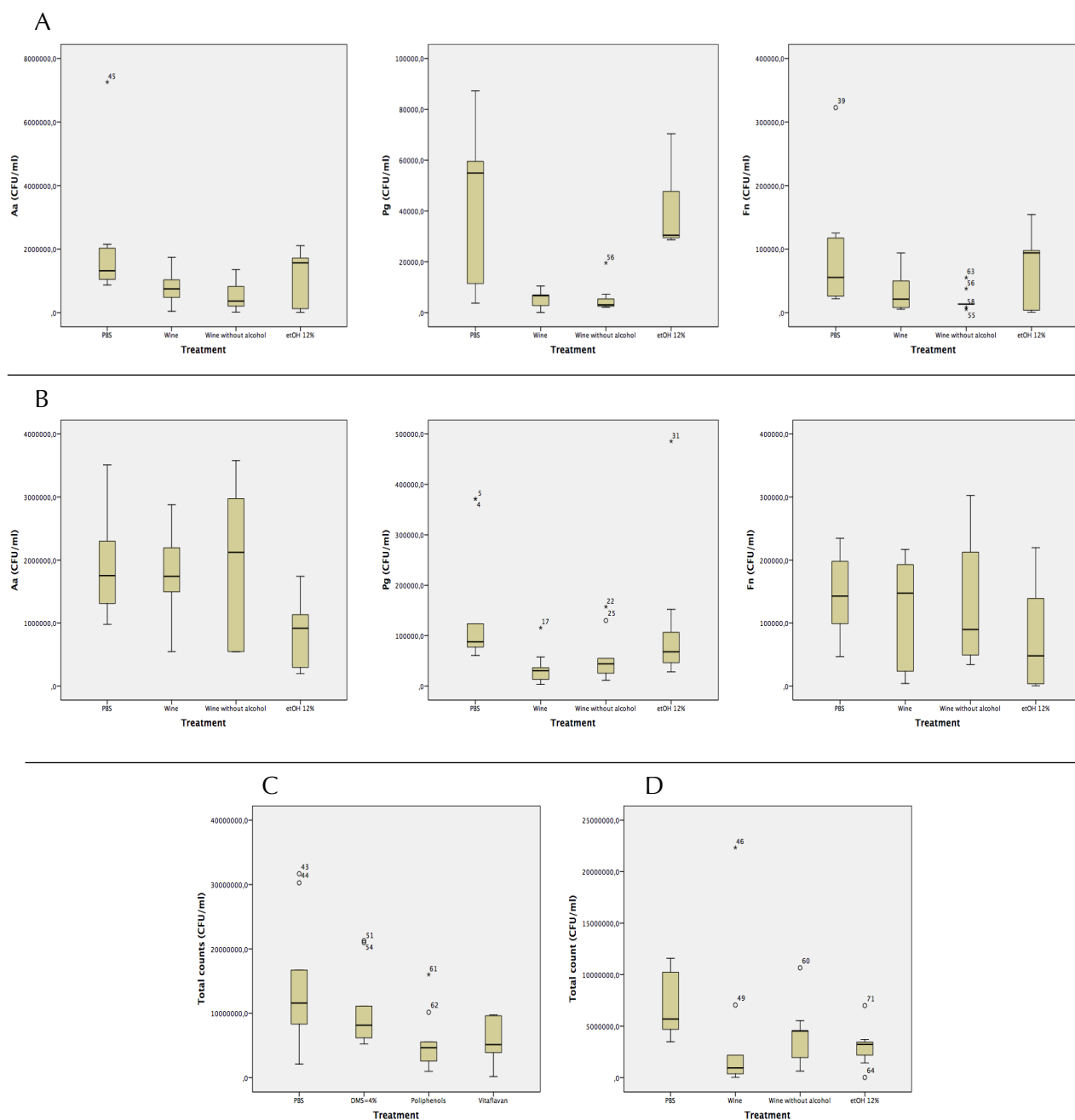
## Resultados

### Efectos antimicrobianos del vino tinto (desalcoholizado o no) sobre la biopelícula

Los efectos antimicrobianos del vino tinto y del vino desalcoholizado, comparado con el control negativo (PBS) y positivo (EtOH 12%), en el número de bacterias vitales de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y el número total de bacterias se representa en la tabla 5 y la representación en box plots de los resultados se puede ver en la Figura 3.

**Tabla 5.** Efecto del vino tinto y del vino tinto desalcoholizado en el número de bacterias viables en la biopelícula de crecimiento *in vitro*, expresado como el recuento de bacterias vivas [(Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL)], cuantificadas mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los datos fueron expresados como medias con desviaciones estándar (DS). PBS: Tampón fosfato salino; EtOH: Etanol.

	Tiempo de Exposición (min)	Control negativo (PBS)	Número de bacterias viables [UFC/mL (Desviación Estándar)]		
			Tratamiento con los distintos agentes		
			Vino tinto	Vino tinto sin alcohol	EtOH 12%
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1	1,9x10 <sup>5</sup> (7,6x10 <sup>5</sup> )	1,8x10 <sup>6</sup> (6,5x10 <sup>5</sup> )	1,9x10 <sup>6</sup> (1,2x10 <sup>6</sup> )	8,9x10 <sup>5</sup> (5,6x10 <sup>5</sup> )
	5	2,0x10 <sup>5</sup> (2,0x10 <sup>6</sup> )	7,7x10 <sup>5</sup> (5,1x10 <sup>5</sup> )	5,1x10 <sup>5</sup> (4,5x10 <sup>5</sup> )	1,1x10 <sup>6</sup> (8,6x10 <sup>5</sup> )
<i>P. gingivalis</i>	1	1,5x10 <sup>5</sup> (1,3x10 <sup>5</sup> )	3,4x10 <sup>4</sup> (3,5x10 <sup>4</sup> )	5,9x10 <sup>4</sup> (5,1x10 <sup>4</sup> )	1,2x10 <sup>5</sup> (1,4x10 <sup>5</sup> )
	5	4,2x10 <sup>4</sup> (3,3x10 <sup>4</sup> )	5,2x10 <sup>3</sup> (3,2x10 <sup>3</sup> )	5,3x10 <sup>3</sup> (5,6x10 <sup>3</sup> )	3,9x10 <sup>4</sup> (1,4x10 <sup>4</sup> )
<i>F. nucleatum</i>	1	1,4x10 <sup>5</sup> (7,1x10 <sup>4</sup> )	1,1x10 <sup>5</sup> (9,1x10 <sup>4</sup> )	1,2x10 <sup>5</sup> (1,0x10 <sup>5</sup> )	8,1x10 <sup>4</sup> (8,5x10 <sup>4</sup> )
	5	9,2x10 <sup>4</sup> (9,5x10 <sup>4</sup> )	3,4x10 <sup>4</sup> (3,1x10 <sup>4</sup> )	1,9x10 <sup>4</sup> (1,6x10 <sup>4</sup> )	6,5x10 <sup>4</sup> (5,6x10 <sup>4</sup> )
<b>Bacterias totales</b>	1	8,2x10 <sup>6</sup> (4,2x10 <sup>6</sup> )	3,7x10 <sup>6</sup> (2,7x10 <sup>6</sup> )	3,3x10 <sup>6</sup> (2,7x10 <sup>6</sup> )	5,9x10 <sup>6</sup> (7,9x10 <sup>6</sup> )
	5	7,2x10 <sup>6</sup> (3,1x10 <sup>6</sup> )	3,9x10 <sup>6</sup> (7,2x10 <sup>6</sup> )	4,0x10 <sup>6</sup> (3,1x10 <sup>6</sup> )	3,0x10 <sup>6</sup> (1,9x10 <sup>6</sup> )



**Figura 3.** Representación de los box plots del efecto del tratamiento con el vino tinto y el vino tinto desalcoholizado, respecto a los controles PBS (Tampón fosfato salino) y EtOH (Etanol) al 12%; (A) Al minuto de exposición; (B) A los 5 minutos de exposición. (C,D) Comparación en la reducción de bacterias totales dependiendo del tiempo de exposición (C) a un minuto; (D) a los 5 minutos. Pg (*P. gingivalis*), Aa (*A. actinomycetemcomitans*), Fn (*F. nucleatum*).

Las bacterias vitales medidas como UFC/mL de *A. actinomycetemcomitans* no experimentaron reducción después de la exposición de 1 minuto a vino tinto o vino tinto desalcoholizado ( $p=1,000$  en ambos casos) (Tabla 5; Figura 3). Sin embargo, cuando la exposición se incrementó a 5 minutos, el número de bacterias sufrió una reducción tanto con vino tinto ( $p=0,053$ ) como con vino tinto desalcoholizado ( $p=0,011$ ) (Tabla 5; Figura 3). Cuando se comparó el efecto antimicrobiano entre ambas soluciones enológicas después de 1 minuto y de 5 minutos de exposición, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$  en todos los casos). El efecto del tiempo de exposición (1 *versus* 5 minutos) fue estadísticamente significativo para el vino tinto ( $p=0,030$ ) y vino tinto desalcoholizado ( $p=0,006$ ).

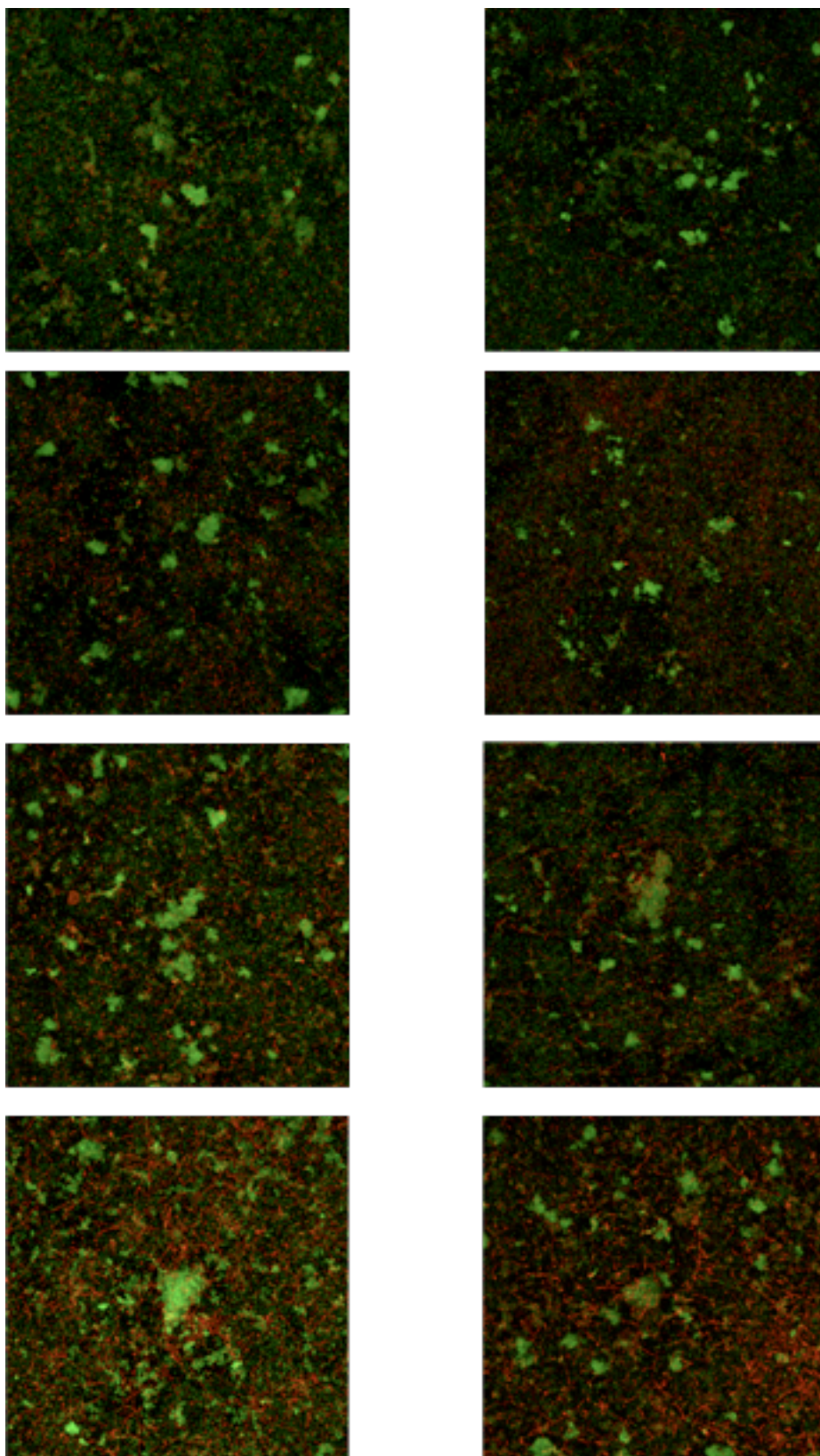
La bacteria *P. gingivalis* presentó una reducción significativa en el número de bacterias vitales en la biopelícula después de la exposición de 1 minuto a vino tinto ( $p=0,008$ ), sufriendo menor reducción en su vitalidad cuando se expuso a vino tinto desalcoholizado (Tabla 5; Figura 3). De nuevo, a los 5 minutos de exposición, *P. gingivalis* experimentó una reducción relevante en el número de células viables, pero sin llegar a un valor estadísticamente significativo ( $p=1,000$  en cada caso) (Tabla 5; Figura 3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos soluciones enológicas a ningún tiempo ( $p>0,05$  en todos los casos), así como tampoco para cada solución, dependiendo del tiempo de exposición para cada tratamiento ( $p>0,05$  para cada caso).

Para *F. nucleatum*, 1 minuto de exposición al vino tinto y vino tinto desalcoholizado no fue suficiente para conseguir una reducción de la carga bacteriana. En cualquier caso, se pudo observar una reducción después de 5 minutos de tratamiento, siendo el vino tinto desalcoholizado la solución antiséptica más efectiva ( $p=0,251$ ) (Tabla 5; Figura 3). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas soluciones a ningún

tiempo ( $p=1,000$ ). El efecto del tiempo de exposición (1 *versus* 5 minutos) fue estadísticamente significativo para el vino tinto ( $p=0,035$ ) y vino tinto desalcoholizado ( $p=0,004$ ).

Con respecto al número total de bacterias, estas experimentaron una importante reducción después de la exposición a las dos soluciones mencionadas anteriormente, apareciendo el vino tinto desalcoholizado ligeramente superior en efectividad al vino tinto ( $p=0,164$  y  $0,230$ , respectivamente), después de 1 minuto de exposición (Tabla 5; Figura 3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos soluciones enológicas a ningún tiempo ( $p>0,05$  en todos los casos), así como tampoco para cada solución, dependiendo del tiempo de exposición para cada tratamiento ( $p>0,05$  para cada caso).

El análisis por microscopía CLSM muestran cómo, después de 72 horas de incubación, las biopelículas cubrían los discos de HA con una capa discontinua de células, entre las que se pueden distinguir las estructuras características de las biopelículas con células agrupadas en “torres” multi-especies. (Figura 4 A, B). En comparación con los controles (Figura 4 A, B), se puede observar una reducción de la vitalidad celular cuando las biopelículas fueron sumergidas en vino tinto durante 1 y 5 minutos (Figura 4 E, F) y vino tinto desalcoholizado (Figura 4 G,H). También, se observaron dichas reducciones en la vitalidad cuando se aplicó la solución EtOH al 12% (Figura 4 C, D).



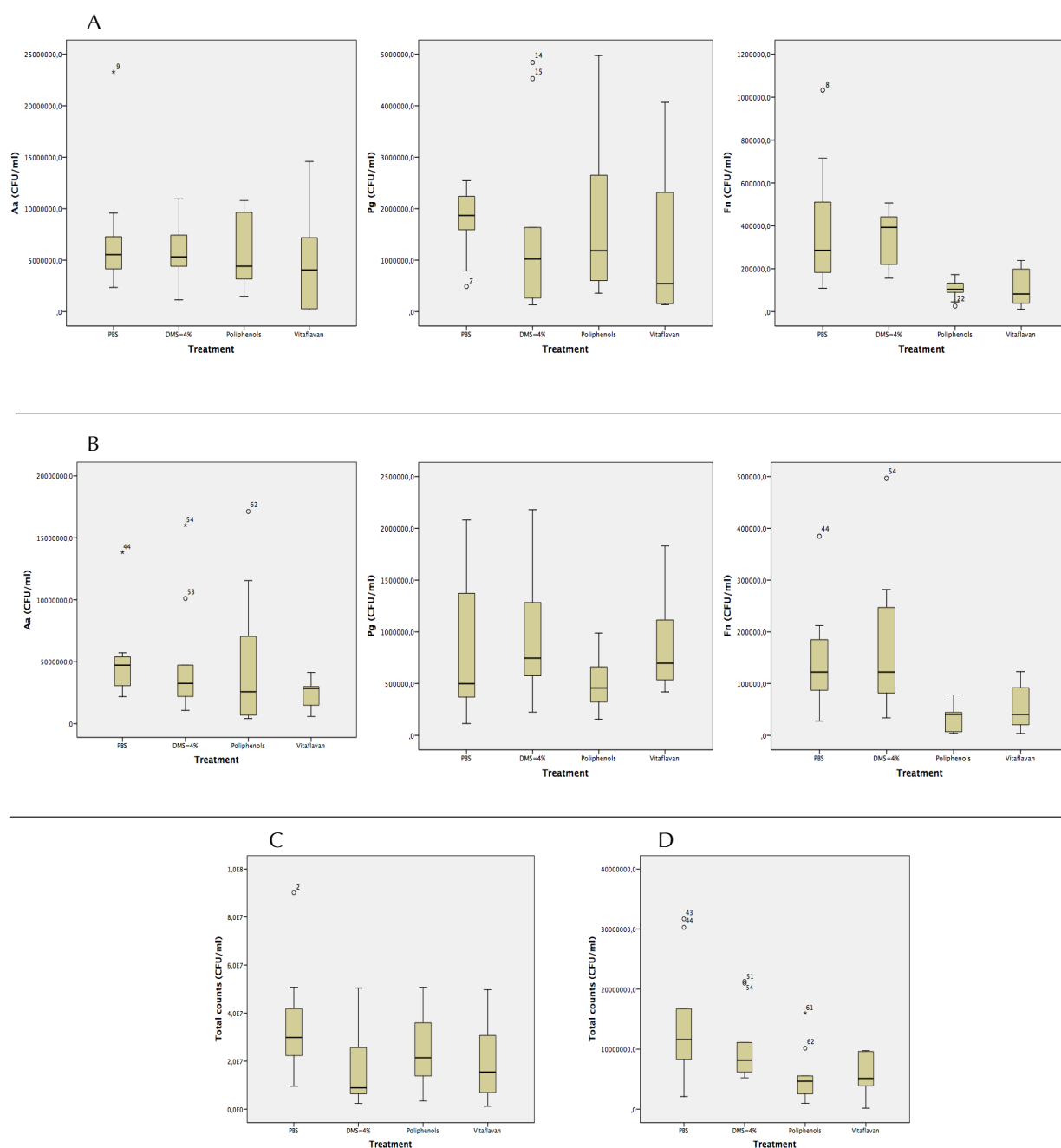
**Figure 4.** Máxima proyección de microscopía láser de barrido (CLSM) a las 72 horas de la formación de la biopelícula sobre los discos de hidroxiapatita, teñido con LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, después de la exposición a: (A, B) control negativo 1 y 5 minutos, respectivamente (Tampón fosfato salino, PBS); (C, D) Solución de etanol al 12% 1 y 5 minutos, respectivamente; (E, F) vino tinto 1 y 5 minutos, respectivamente, y (G, H) Vino tinto desalcoholizado 1 y 5 minutos, respectivamente.

## Efectos antimicrobianos de los extractos enológicos Provinols™ y Vitaflavan® sobre la biopelícula

Los efectos de los extractos Provinols™ y Vitaflavan® comparado con los controles positivo (DMSO 4%) y negativo (PBS), en el número total de bacterias vitales de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, así como el número total de todas las bacterias se recoge en la Tabla 6 y la representación en box plots de los resultados se puede ver en la Figura 5.

**Tabla 6.** Efecto del extracto polifenólico (Provinols™), especialmente rico en antocianinas y del extracto enológico de semilla de uvas (Vitaflavan®) en el número de bacterias vitales en la biopelícula de crecimiento *in vitro*. [Unidades formadoras de colonia, UFC/mL obtenidas mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)]. Los datos fueron expresados como medias con desviaciones estándar (DS). PBS: Tampón fosfato salino; DMSO: dimetilsulfóxido.

	Tiempo de Exposición	Control negativo (PBS)	Número de bacterias viables [UFC/mL (Desviación Estándar)]		
			Tratamiento con los distintos agentes		
			Provinols™	Vitaflavan®	DMSO 4%
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	30 seg	7,2x10 <sup>6</sup> (6,4x10 <sup>6</sup> )	5,8x10 <sup>6</sup> (3,8x10 <sup>6</sup> )	5,2x10 <sup>6</sup> (5,2x10 <sup>6</sup> )	5,6x10 <sup>6</sup> (3,0x10 <sup>6</sup> )
	1 min	5,2x10 <sup>6</sup> (3,7x10 <sup>6</sup> )	5,0x10 <sup>6</sup> (5,8x10 <sup>6</sup> )	2,4x10 <sup>6</sup> (1,2x10 <sup>6</sup> )	5,2x10 <sup>6</sup> (4,9x10 <sup>6</sup> )
<i>P. gingivalis</i>	30 seg	1,7x10 <sup>6</sup> (7,0x10 <sup>5</sup> )	1,8x10 <sup>6</sup> (1,5x10 <sup>6</sup> )	1,3x10 <sup>6</sup> (1,5x10 <sup>6</sup> )	1,6x10 <sup>6</sup> (1,8x10 <sup>6</sup> )
	1 min	8,9x10 <sup>5</sup> (6,8x10 <sup>5</sup> )	5,0x10 <sup>5</sup> (2,6x10 <sup>5</sup> )	8,5x10 <sup>5</sup> (4,7x10 <sup>5</sup> )	1,0x10 <sup>6</sup> (7,0x10 <sup>5</sup> )
<i>F. nucleatum</i>	30 seg	3,8x10 <sup>5</sup> (3,1x10 <sup>5</sup> )	1,0x10 <sup>5</sup> (4,6x10 <sup>4</sup> )	1,1x10 <sup>5</sup> (9,2x10 <sup>4</sup> )	3,5x10 <sup>5</sup> (1,3x10 <sup>5</sup> )
	1 min	1,5x10 <sup>5</sup> (1,0x10 <sup>5</sup> )	3,3x10 <sup>4</sup> (2,7x10 <sup>4</sup> )	5,4x10 <sup>4</sup> (4,2x10 <sup>4</sup> )	1,8x10 <sup>5</sup> (1,5x10 <sup>5</sup> )
<b>Bacterias totales</b>	30 seg	3,6x10 <sup>7</sup> (2,3x10 <sup>7</sup> )	2,5x10 <sup>7</sup> (1,5x10 <sup>7</sup> )	1,9x10 <sup>7</sup> (1,7x10 <sup>7</sup> )	1,9x10 <sup>7</sup> (1,9x10 <sup>7</sup> )
	1 min	1,3x10 <sup>7</sup> (1,1x10 <sup>7</sup> )	5,5x10 <sup>6</sup> (4,7x10 <sup>6</sup> )	5,6x10 <sup>6</sup> (3,4x10 <sup>6</sup> )	1,1x10 <sup>7</sup> (6,2x10 <sup>6</sup> )



**Figura 5.** Efecto del tratamiento con los extractos Provinols™ y Vitaflavan®, respecto a los controles PBS (Tampón fosfato salino) y EtOH (Etanol) al 12%; representado en forma de diagrama de cajas. (A) A los 30 segundos de exposición; (B) Al minuto de exposición. (C, D) Comparación en la reducción de las bacterias totales dependiendo del tiempo de exposición; (C) 30 segundos (D) 1 minuto. Pg (*P. gingivalis*), Aa (*A. actinomycetemcomitans*), Fn (*F. nucleatum*).



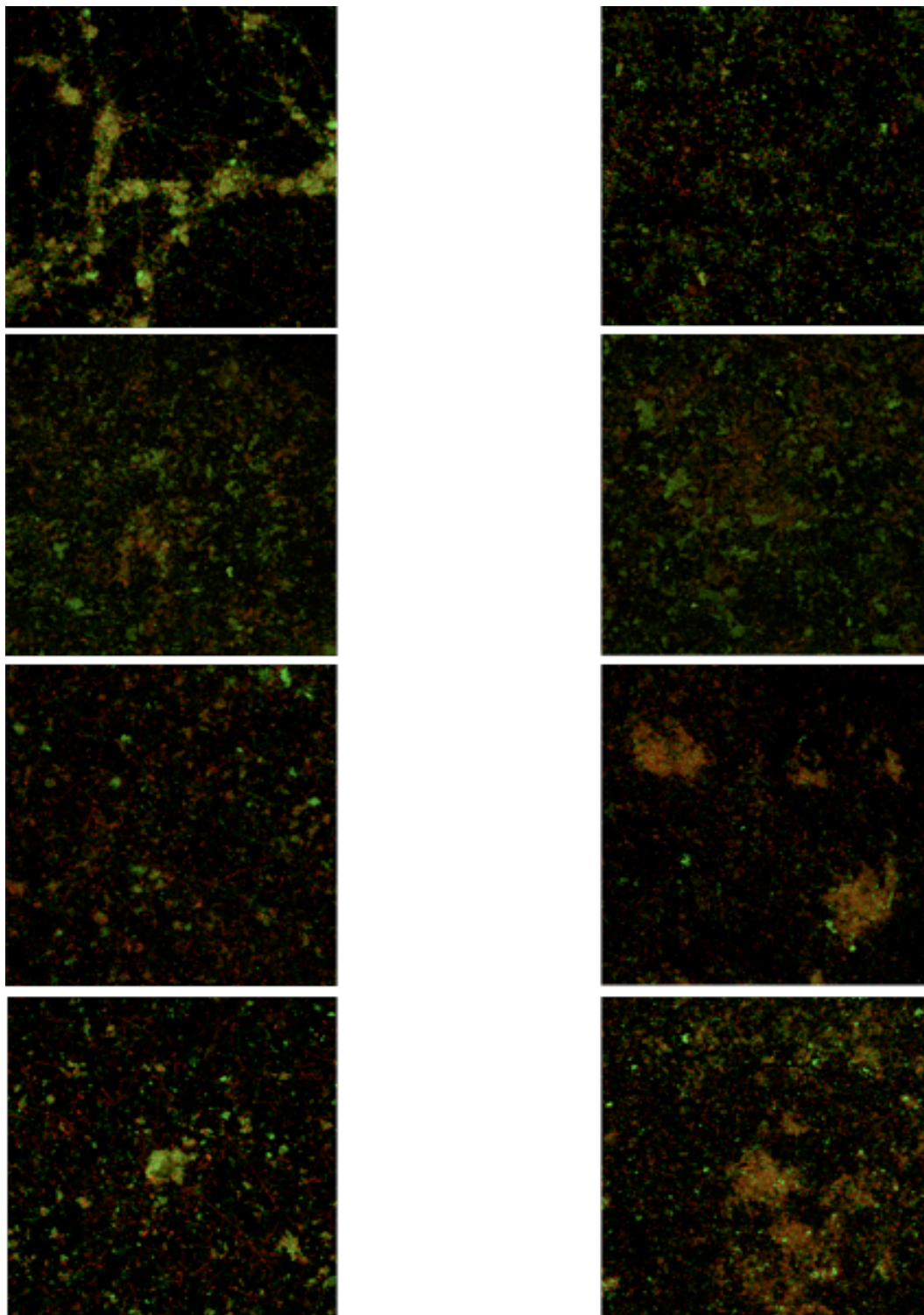
El número de las células vitales de *A. actinomycetemcomitans* se redujo después de la exposición de 30 segundos a Provinols™ y Vitaflavan® ( $p=1,000$  en ambos casos) (Tabla 6; Figura 5). Cuando la exposición con Vitaflavan® alcanzó 1 minuto, de nuevo se observó una reducción en el recuento de *A. actinomycetemcomitans* viables, menos pronunciada para Provinols™ ( $p=1,000$  en ambos casos) (Tabla 6; Figura 5). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos extractos enológicos a ningún tiempo ( $p>0,05$  para cada caso), así como tampoco para cada extracto, dependiendo del tiempo de exposición para cada tratamiento ( $p>0,05$  para cada caso).

El recuento de células vitales de *P. gingivalis* no sufrió ninguna reducción después de la exposición a Provinols™ y Vitaflavan® durante 30 segundos (Tabla 6; Figura 5). Sin embargo, cuando la exposición con Provinols™ se llevó hasta 1 minuto, el número de bacterias vitales de *P. gingivalis* experimentó una reducción ( $p=1,000$ ), que no ocurrió cuando fue tratado con Vitaflavan® ( $p=1,000$ ) (Tabla 6; Figura 5). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos extractos a ningún tiempo ( $p=1,000$  para cada caso). El efecto del tiempo de exposición (1 *versus* 5 minutos) fue estadísticamente significativo para Provinols™ ( $p=0,014$ ), pero no para Vitaflavan® ( $p=0,395$ ).

Para *F. nucleatum*, 30 segundos de exposición a Provinols™ y Vitaflavan® redujeron el recuento bacteriano de forma estadísticamente significativa ( $p=0,001$  en ambos casos) (Tabla 6; Figura 5). Aumentando el tiempo de contacto a 1 minuto, se mantuvo la reducción, siendo más efectiva la solución de Provinols™ ( $p=0,457$ ) que Vitaflavan® ( $p=0,842$ ) (Tabla 6; Figura 5). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos extractos enológicos a ningún tiempo ( $p>0,05$  para cada caso), así como tampoco para cada extracto, dependiendo del tiempo de exposición para cada tratamiento ( $p>0,05$  para cada caso).

Con respecto al número total de bacterias vitales, se observó una ligera reducción después de la exposición de 30 segundos a Provinols™ y Vitaflavan® ( $p=0,575$  y  $0,065$ , respectivamente) (Tabla 6; Figura 5). Al contrario, cuando la exposición alcanza el minuto, el número total de bacterias sufre una reducción importante ( $p=1,000$ ) (Tabla 6; Figura 5). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos extractos a ningún tiempo ( $p=1,000$  para cada caso). El efecto del tiempo de exposición (1 *versus* 5 minutos) fue estadísticamente significativo para Provinols™ ( $p=0,005$ ), pero no para Vitaflavan® ( $p=0,057$ ).

El análisis por microscopía CLSM nos permitió observar que, tras 72 horas de incubación de la biopelícula, los discos de HA estaban cubiertos por una capa de bacterias, junto con las típicas agregaciones bacterianas. (Figura 6A, B). Se observó, que tras la exposición durante 30 segundos de Provinols™ y Vitaflavan®, y también de solución al 4% de DMSO, la vitalidad celular decreció en las mismas. Después de 1 minuto de exposición a Provinols™ (Figura 6 F) y Vitaflavan® (Figura 6 H), la reducción en la vitalidad fue mayor. No se observaron cambios apreciables cuando se aplicó solución DMSO al 4% (Figura 6 C, D).



**Figure 6.** Máxima proyección de microscopía láser de barrido (CLSM) a las 72 horas de la formación de la biopelícula sobre los discos de hidroxiapatita, teñido con LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, después de la exposición a: (A, B) control negativo a los 30 segundos y 1 minuto, respectivamente (Tampón fosfato salino, PBS); (C,D) DMSO al 4% durante 30 segundos y 1 minuto, respectivamente; (E,F) extracto de vino durante 30 segundos y 1 minuto, respectivamente (Provinols, 20 g L<sup>-1</sup>); y (G, H) Extracto de semilla de uvas (Vitaflavan, 20 g L<sup>-1</sup>) 30 seg y 1 minuto, respectivamente.

## Discusión

Los resultados de este estudio aportan una información relevante que podría ser utilizada para el manejo de las enfermedades periodontales, ya que proporcionan evidencia de que el vino tinto (desalcoholizado o no) y los extractos enológicos empleados (Provinols<sup>TM</sup> y Vitaflavan<sup>®</sup>) tienen éxito, en mayor o menor medida, a la hora de reducir la carga total bacteriana, sugiriendo además, que los patógenos periodontales *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* son susceptibles a la acción de los mismos.

Como es sabido, las enfermedades periodontales, en concreto la periodontitis, son causadas por bacterias, donde la especificidad de estas juega un papel clave (Papapanou y cols. 2000; Socransky y Haffajee 1998; 2005). Además, el objetivo último del tratamiento periodontal es la reducción de estas bacterias periodonto patógenas, asociándose su permanencia con la continuación o progresión de la enfermedad tras el tratamiento (Listgarten y cols. 1988; Rams y cols. 1996; Haffajee y Socransky 1994; Haffajee y cols. 2006). Se ha demostrado que el tratamiento antimicrobiano de las bolsas periodontales lleva a la mejora de la patología, incluso con diferentes terapias (Heitz-Mayfield y cols. 2002; Tonetti y Chapple 2011; Herrera y cols. 2012). Sin embargo, la eliminación de las bacterias periodonto patógenas con una instrumentación manual no siempre es posible, tanto en bacterias anaerobias facultativas como *A. actinomycetemcomitans* (Mombelli y cols. 1994; Slots y Rosling 1983; Kornman y Robertson 1985; Christersson y cols. 1985), como en bacterias anaerobias como *P. gingivalis* o *F. nucleatum* (Mombelli y cols. 2000). Ante esto, surge la necesidad, en algunas ocasiones, de suplementar el tratamiento con sustancias antimicrobianas, que a pesar de su eficacia (Herrera y cols. 2008; 2012; Sanz y cols. 2012; Matesanz-Pérez y cols. 2013) no están exentas de efectos adversos (Serrano y cols. 2005; Hersh y Moore 2008).

Para evitar los posibles efectos no deseados de los antisépticos orales y el desarrollo de resistencias antibióticas, el estudio presentado evalúa la capacidad antibacteriana del vino tinto y vino tinto desalcoholizado, así como de los extractos enológicos Provinols™, especialmente rico en antocianinas, y Vitaflavan®, extracto enológico de semillas de uva, contra los patógenos periodontales en un modelo de biopelícula formada *in vitro*, lo cual puede tener un impacto futuro en el desarrollo de estrategias para el manejo de las enfermedades periodontales.

Las uvas y el vino están considerados como una amplia fuente de componentes polifenólicos, incluyendo ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, alcoholes fenólicos, monómeros Flavan-3-oles, procianidinas poliméricas y oligoméricas, flavonoles, estilbenos y antocianinas (solo presentes en la variedad de vino tinto) (Monagas y cols. 2003). La aplicación de los polifenoles que contiene el vino tinto, como uso para la prevención y el tratamiento de enfermedades, ha sido ampliamente descrito en la literatura (Helm and Macdonald 2015), sin embargo, su papel como antimicrobianos no ha sido descrito en profundidad. En esta dirección, Navarro y colaboradores (2000) demostraron que distintas bacterias ácido lácticas, en el vino tinto del tipo Rioja, producían bacteriocinas durante la fermentación alcohólica y maloláctica del mismo, asignándoles un papel de acción antimicrobiana. Sugita-Konishi y colaboradores (2001) investigaron la actividad antibacteriana *in vitro* del vino tinto y del vino blanco frente a enterobacterias patógenas. También ha sido descrita la actividad antimicrobiana de distintos vinos contra seis cepas de *Helicobacter pylori* de biopsias gástricas (Daroch y cols. 2001; Mahady y cols. 2003). Dolar y colaboradores (2005) investigaron la actividad antibacteriana contra bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas de vinos caseros e industriales. Recientemente, Cueva y

colaboradores (2012) observaron el efecto de los polifenoles del vino y de los extractos enológicos en el crecimiento de bacterias patógenas asociadas a enfermedades respiratorias.

La actividad antimicrobiana de estos compuestos en cuanto a las caries y a la enfermedad periodontal también ha sido descrita. Toukairin y colaboradores (1991) reflejaron que los compuestos polifenólicos extraídos de las semillas y de la piel de la uva tenían capacidad antibacteriana en bacterias cariogénicas y propiedades antiadhesivas para el *S. mutans* y otros estreptococos. Cueva y colaboradores (2012) mostraron una inhibición significativa en el crecimiento de algunos estreptococos orales como *S. mutans* y *S. sobrinus*, cuando eran incubados en cultivos planctónicos junto con precursores de Flavan-3-oles, (+)-catequinas y (–)-epicatequinas, en la que los extractos de semillas son particularmente ricos. También Muñoz-González y colaboradores (2014) observaron la capacidad antimicrobiana del vino tinto y sus componentes en la microbiota oral, frente a *A. oris*, *F. nucleatum* y *S. oralis*.

Aunque muchos de los estudios muestran las capacidades de los polifenoles como agentes antimicrobianos, casi todos ellos están realizados en modelos de crecimiento planctónico *in vitro*, y muy pocos muestran el posible efecto sobre las biopelículas. Debido a que la placa dental y las biopelículas ofrecen protección contra los agentes antimicrobianos (Mah and O'Toole 2001; Socransky y Haffajee 2002; Davey y Costerton 2006; Marsh y cols. 2011), un importante paso de la investigación es evaluar estos posibles agentes antimicrobianos sobre una biopelícula multi-especie de formación *in vitro* (Sánchez y cols. 2011), incluyendo tres especies relacionadas con las enfermedades periodontales (*F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*).

Una consideración importante para los experimentos basados en polifenoles frente a bacterias, es la solubilidad de estos compuestos. Muchos polifenoles son insolubles en agua, de manera que se usan normalmente solventes como el dimetilsulfóxido (DMSO), metanol o

etanol. Además, el vino tinto incluye en su composición etanol, normalmente al 10 o 12 %, lo que hace que tengan actividad antibacteriana por sí mismo. El hecho de que la mayoría de los solventes tengan capacidad antibacteriana puede ser un problema a la hora de analizar los datos. Los resultados obtenidos confirman que el DMSO en una concentración del 4.0% (v/v), usado para solubilizar los extractos, no tiene un efecto distinguishable en la vitalidad de las cepas (Tabla 6). Por el contrario, el tratamiento con etanol al 12%, emulando el contenido de alcohol que posee el vino tinto, resultó en un decrecimiento en la población de bacterias vitales (Tabla 5). Estas observaciones coinciden con lo descrito por Muñoz-González y colaboradores (2014), quien estudiaron los efectos antimicrobianos del vino tinto alcoholizado y desalcoholizado en un modelo de biopelícula supragingival, y mostraron como *F. nucleatum* después de la exposición con etanol al 12% experimentaba una reducción significativa en su población. La conclusión de estos autores, como en nuestro caso, es que a parte de la capacidad antimicrobiana del etanol al 12% debe haber otros componentes en el vino que tienen también esa capacidad contra esta especie bacteriana.

Los resultados obtenidos en el modelo de biopelícula *in vitro* utilizado, han mostrado como el vino tinto alcoholizado y desalcoholizado presentan cierta capacidad antimicrobiana frente a los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*. Se pudo observar como las soluciones del vino tinto aplicadas necesitan al menos 5 minutos de exposición para tener un efecto relevante en la vitalidad de las cepas bacterianas incluidas en la biopelícula. Se pudo observar la excepción de *P. gingivalis*, que presenta una reducción del número de UFC/mL con tan solo 1 minuto de exposición (Tabla 5; Figura 3). El efecto también se reflejó en el número de bacterias totales en la biopelícula (Tabla 5; Figura 3). Cuando se compara el efecto antimicrobiano del vino tinto con alcohol y sin

alcohol, después de 1 o 5 minutos de exposición respectivamente, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Así que, como se ha mencionado previamente, se puede deducir que otro componente aparte del etanol puede tener capacidad antimicrobiana contra algunas especies bacterianas. Estas observaciones concuerdan con las descritas por Furiga y colaboradores, los cuales llevaron a cabo dos estudios sobre la actividad antiplaca de varios extractos obtenidos de *Vitis vinifera* (Vitaceae) contra biopelículas artificiales, compuestas principalmente de *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. rhamnosus*, *P. gingivalis*, y *F. nucleatum* (Furiga y cols. 2008; Furiga y cols. 2014). Los resultados también concuerdan con los descritos por Muñoz-González y colaboradores (2014), que describieron el efecto antibacteriano beneficioso de los vinos en la cavidad oral, mostrando una alta actividad bactericida frente, entre otros, a *A. oris*, *F. nucleatum*, y *S. oralis*. Daglia y colaboradores también estudiaron el efecto antiséptico del vino tinto desalcoholizado (Daglia y cols. 2007), observando una fuerte actividad en contra de estreptococos orales, incluso más alta que la obtenida con vinos blancos, los cuales no poseen antocianinas. Esto refuerza la teoría de la actividad antimicrobiana de componentes del vino tinto aparte del etanol, y centra la atención en el posible efecto en las antocianinas (solo presente en la variedad del vino tinto).

Además, se ha estudiado el efecto antibacteriano de un extracto de los polifenoles del vino (Provinols<sup>TM</sup>), especialmente rico en antocianinas, y otro extracto enológico obtenido de las semillas de la uva (Vitaflavan<sup>®</sup>) (Tabla 3; Figura 5). Se verificó que, desde los 30 segundos de exposición, el efecto antimicrobiano era significativamente efectivo, con la excepción de *P. gingivalis*. Después de 1 minuto de tratamiento con los extractos enológicos todas las bacterias redujeron su vitalidad, decreciendo significativamente respecto al control con PBS. De nuevo, la excepción fue *P. gingivalis* cuando fue expuesta a Vitaflavan<sup>®</sup>. Los extractos



polifenólicos del vino (Provinols™) presentaron un mayor efecto, aunque cuando la actividad antimicrobiana de ambas soluciones fue comparada después de 30 segundos o 1 minuto a la exposición respectivamente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. Resultados similares obtuvieron Shahzad y colaboradores (2005), los cuales mostraron las propiedades antibacterianas contra *A. actinomycetemcomitans*. En nuestro caso, el vino tinto (desalcoholizado o no) mostró una mayor capacidad antimicrobiana que los extractos enológicos. De nuevo, podemos observar el posible papel clave de las antocianinas. Sin embargo, estos resultados difieren de los observados por Cueva y colaboradores (2012), los cuales reflejaron que los extractos de semillas de uva, especialmente Vitaflavan® y su fracción oligomérica, ejercían mayor capacidad antimicrobiana contra varios patógenos orales, que el resto de los extractos estudiados (extracto de vino tinto y extracto de la pulpa de la uva).

En estudios previos, los beneficios antibacterianos de la uva y del vino dentro de la cavidad oral, mostraban que las primeras tenían una alta capacidad antimicrobiana contra distintos microorganismos como *A. oris*, *F. nucleatum* y *S. oralis* (Furiga y cols. 2008; 2014; Muñoz-González y cols. 2014), algunos de ellos incluidos en el modelo presentado. Furiga y colaboradores (2008), usaron un modelo de biopelícula formado *in vitro* muy similar al presentado en este estudio, llevando a cabo una investigación basada en la aplicación durante 1 minuto del extracto de la pulpa de uvas rojas y del extracto de vino tinto en concentraciones que oscilaban entre 50 a 2000 µg ml<sup>-1</sup> a intervalos de 4 horas durante 16 horas, que resultó en un efecto antiadhesivo para las bacterias, siendo el extracto de vino tinto quien mostró el mayor efecto antibacteriano. También en estudios posteriores del mismo grupo (Furiga y cols. 2014), el extracto de semilla de uva a una concentración de 2000 µg/ml, solo o enriquecido con 3-piridinemetanol hidrofluoruro, fue utilizado como

tratamiento en una biopelícula de formación *in vitro* durante 1 minuto, en intervalos de 4 horas, sobre un total de 64 horas. El extracto mostró los efectos antimicrobianos de esta sustancia ante *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. rhamnosus*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. viscosus*, aunque la combinación de extractos y fluoruros exhibía las mayores propiedades antiplaca. El vino tinto (desalcoholizado o no) y el vino tinto (1,6 g/L) enriquecido con extracto de semilla de uva (2,5 g/100 ml) o con levadura seca inactiva (IDY, 0,4 g/L) fue también evaluado ante una biopelícula con diferentes especies (*A. oris*, *F. nucleatum*, *S. oralis*, *S. mutans*, *V. dispar*), formada *in vitro* por Muñoz-González y colaboradores (2014). La biopelícula fue tratada durante 2 minutos a intervalos de 7 horas, durante 7 días. Como resultado, el total de la carga bacteriana de *F. nucleatum* y *S. oralis* disminuyó con el tratamiento del vino tinto, solo o enriquecido con extracto de semillas de uva, y con vino desalcoholizado.

Por tanto, y de forma global, nuestras observaciones evidencian que el vino tinto (con alcohol o sin alcohol) y los extractos enológicos usados (Provinols<sup>TM</sup> y Vitaflavan<sup>®</sup>), tienen éxito en reducir el número total de bacterias y las bacterias periodonto patógenas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. El estudio realizado refleja los efectos de varias sustancias naturales que podrían ser considerados como posibles futuras estrategias para la prevención y el manejo de las enfermedades periodontales.

## Conclusiones

- Los resultados proporcionan evidencia de que el vino tinto (desalcoholizado o no) y los extractos enológicos utilizados en el estudio (Provinols™ y Vitaflavan®) tienen éxito a la hora de reducir la carga total bacteriana, sugiriendo que los patógenos periodontales *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* son susceptibles a la acción de los mismos.
- El vino tinto y el vino tinto desalcoholizado provocan una reducción significativa en el número de bacterias viables de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y en el total de las bacterias incluidas en una biopelícula multi-especie, generada *in vitro* después de 5 minutos de exposición. Solamente *P. gingivalis* sufre una reducción de la vitalidad después de 1 minuto de tratamiento tanto con el vino tinto como con la solución desalcoholizada.
- Se encontraron diferencias significativas en *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y en el número total de bacterias de la biopelícula después de la exposición de 30 segundos y 1 minuto ante los extractos Provinols™ y Vitaflavan®, con un efecto menor sobre *P. gingivalis*.

## Agradecimientos

Al Dr. David Herrera, mi tutor, a quien agradezco me haya aceptado y apoyado como tutorizado. También por aportarme su confianza e inculcarme nuevos conceptos y motivación. Igualmente quiero agradecer al Dr. Mariano Sanz y la Dra. Elena Figuero por darme la oportunidad de trabajar junto a su equipo.

Al equipo de la Dra. M.V. Moreno-Arribas, del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, Madrid, por su dedicación y entusiasmo en el estudio.

A todo el personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología, por su ayuda y, un especial agradecimiento a la Dra. María Sánchez, porque la realización de este trabajo hubiese sido imposible sin su gran ayuda y su entusiasmo por enseñar y transmitir sus conocimientos.

A todos mis compañeros del máster y amigos.

## Bibliografía

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 5721-5732.
- Arts, I. C. W. & Hollman, P. C. H. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**, 317S-325S.
- Badet, C. & Quero, F. (2011) The in vitro effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. *Anaerobe* **17**, 19-22.
- Bakri, I. M. & Douglas, C. W. I. (2005) Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of Oral Biology* **50**, 645-651.
- Beecher, G. R. (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition* **133**, 3248S-3254S.
- Beikler, T., Abdeen, G., Schnitzer, S., Sälzer, S., Ehmke, B., Heinecke, A. & Flemmig, T. F. (2004) Microbiological shifts in intra- and extraoral habitats following mechanical periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 777-783.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. & Savelkoul, P. H. M. (2003) Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 4950-4954.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. & Savelkoul, P. H. M. (2005) Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS immunology and medical microbiology* **45**, 191-199.
- Choi, J.-S., Ha, Y.-M., Joo, C.-U., Cho, K. K., Kim, S.-J. & Choi, I. S. (2012) Inhibition of oral pathogens and collagenase activity by seaweed extracts. *Journal of Environmental Biology*

- . Christersson, L. A., Slots, J., Rosling, B. G. & Genco, R. J. (1985) Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **12**, 465-476
- . Cobb, C. M. (2002) Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology* **29 Suppl 2**, 6-16.
- . Cueva, C., Mingo, S., Muñoz-González, I., Bustos, I., Requena, T., del Campo, R., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M. V. (2012) Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Letters in Applied Microbiology* **54**, 557-563.
- . Daglia, M., Papetti, A., Grisoli, P., Aceti, C., Dacarro, C. & Gazzani, G. (2007) Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 5038-5042.
- . Daroch, F., Hoeneisen, M., González, C. L., Kawaguchi, F., Salgado, F., Solar, H. & García, A. (2001) In vitro antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbios* **104**, 79-85
- . Davey, M. E. & Costerton, J. W. (2006) Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontology 2000* **42**, 13-26
- . Dolara, P., Arrigucci, S., Cassetta, M. I., Fallani, S. & Novelli, A. (2005) Inhibitory activity of diluted wine on bacterial growth: the secret of water purification in antiquity. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 338-340.
- . Furiga, A., Lonvaud-Funel, A., Dorignac, G. & Badet, C. (2008) In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of natural polyphenolic compounds on oral bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **105**, 1470-1476.

- Furiga, A., Roques, C. & Badet, C. (2014) Preventive effects of an original combination of grape seed polyphenols with amine fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **116**, 761-771.
- Geoghegan, F., Wong, R. W. K. & Rabie, A. B. M. (2010) Inhibitory effect of quercetin on periodontal pathogens in vitro. *Phytotherapy Research: PTR* **24**, 817-820.
- Graf, B. A., Milbury, P. E. & Blumberg, J. B. (2005) Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food* **8**, 281-290.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* **5**, 78-111.
- Haffajee, A. D., Teles, R. P. & Socransky, S. S. (2006) The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontology 2000* **42**, 219-258.
- Hannig, C., Sorg, J., Spitzmüller, B., Hannig, M. & Al-Ahmad, A. (2009) Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. *Journal of Dentistry* **37**, 560-566.
- Heitz-Mayfield, L. J. A., Trombelli, L., Heitz, F., Needleman, I. & Moles, D. (2002) A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **29 Suppl 3**, 92-102- discussion 160-102
- Helm, L. & Macdonald, I. A. (2015) Impact of beverage intake on metabolic and cardiovascular health. *Nutrition Reviews* **73 Suppl 2**, 120-129.
- Herrera, D., Matesanz, P., Bascones-Martínez, A. & Sanz, M. (2012) Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *The journal of Evidence-Based Dental Practice* **12**, 50-60.
- Hersh, E. V. & Moore, P. A. (2008) Adverse drug interactions in dentistry. *Periodontology 2000* **46**, 109-142

- Hill, D. A., Hoffmann, C., Abt, M. C., Du, Y., Kobuley, D., Kirn, T. J., Bushman, F. D. & Artis, D. (2010) Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal Immunology* **3**, 148-158
- Hirasawa, M., Takada, K., Makimura, M. & Otake, S. (2002) Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. *Journal of Periodontal Research* **37**, 433-438.
- Kang, M.-S., Oh, J.-S., Kang, I.-C., Hong, S.-J. & Choi, C.-H. (2008) Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* **46**, 744-750.
- Kornman, K. S. & Robertson, P. B. (1985) Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology* **56**, 443-446.
- La, V. D., Howell, A. B. & Grenier, D. (2010) Anti-*Porphyromonas gingivalis* and anti-inflammatory activities of A-type cranberry proanthocyanidins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 1778-1784.
- Li, M. & Xu, Z. (2008) Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. *Archives of Pharmacal Research* **31**, 640-644.
- Listgarten, M. A. (1988) Bacterial invasion of periodontal tissues. *Journal of Periodontology* **59**, 412-413.
- Mah, T. F. & O'Toole, G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **9**, 34-39.
- Mahady, G. B., Pendland, S. L. & Chadwick, L. R. (2003) Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *The American Journal of Gastroenterology* **98**, 1440-1441.



- . Marsh, P. & Martin, M. (1992) *Oral Microbiology*. Boston, MA: Springer US.
- . Marsh, P. D. (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research* **8**, 263-271.
- . Marsh, P. D. (2005) Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology* **32 Suppl 6**, 7-15.
- . Marsh, P. D., Moter, A. & Devine, D. A. (2011) Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology 2000* **55**, 16-35.
- . Matesanz-Pérez, P., García-Gargallo, M., Figuero, E., Bascones-Martínez, A., Sanz, M. & Herrera, D. (2013) A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 227-241.
- . Middleton, E., Kandaswami, C. & Theoharides, T. C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* **52**, 673-751.
- . Mitjavila, M. T. & Moreno, J. J. (2012) The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochemical Pharmacology* **84**, 1113-1122.
- . Mombelli, A., Gmür, R., Gobbi, C. & Lang, N. P. (1994) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. *Journal of Periodontology* **65**, 827-834.
- . Mombelli, A., Gmür, R., Gobbi, C. & Lang, N. P. (1994) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment. *Journal of Periodontology* **65**, 820-826.
- . Mombelli, A., Schmid, B., Rutar, A. & Lang, N. P. (2000) Persistence patterns of *Porphyromonas*

gingivalis, Prevotella intermedia/nigrescens, and Actinobacillus actinomycetemcomitans after mechanical therapy of periodontal disease. *Journal of Periodontology* **71**, 14-21.

- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O. & Ricardo da Silva, J. M. (2003) Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from Vitis vinifera L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6475-6481.
- Muñoz-González, I., Jiménez-Girón, A., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M. V. (2013) Profiling of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after moderate red wine intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 9470-9479.
- Muñoz-González, I., Thurnheer, T., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M. V. (2014) Red wine and oenological extracts display antimicrobial effects in an oral bacteria biofilm model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 4731-4737.
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A. & Hunter, N. (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology (Reading, England)* **148**, 257-266.
- Navarro, L., Zarazaga, M., Sáenz, J., Ruiz-Larrea, F. & Torres, C. (2000) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 44-51.
- Page, R. C. & Kornman, K. S. (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000* **14**, 9-11.
- Palaska, I., Papathanasiou, E. & Theoharides, T. C. (2013) Use of polyphenols in periodontal inflammation. *European Journal of Pharmacology* **720**, 77-83.
- Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**, 270-278.

- Papapanou, P. N. (2002) Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Annals of Periodontology* **7**, 54-61.
- Papapanou, P. N., Neiderud, A. M., Papadimitriou, A., Sandros, J. & Dahlen, G. (2000) "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *Journal of Periodontology* **71**, 885-897.
- Percival, R. S., Devine, D. A., Duggal, M. S., Chartron, S. & Marsh, P. D. (2006) The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *European Journal of Oral Sciences* **114**, 343-348.
- Quirynen, M. & Van Assche, N. (2011) Microbial changes after full-mouth tooth extraction, followed by 2-stage implant placement. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 581-589.
- Rams, T. E., Degener, J. E. & van Winkelhoff, A. J. (2014) Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. *Clinical Oral Implants Research* **25**, 82-90.
- Rams, T. E. & Slots, J. (1996) Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontology 2000* **10**, 139-159.
- Sachdeo, A., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2008) Biofilms in the edentulous oral cavity. *Journal of Prosthodontics : Official Journal of the American College of Prosthodontists* **17**, 348-356.
- Sakanaka, S., Aizawa, M., Kim, M. & Yamamoto, T. (1996) Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**, 745-749.
- Sampaio, F. C., Pereira, M. d. S. V., Dias, C. S., Costa, V. C. O., Conde, N. C. O. & Buzalaf, M. A. R. (2009) In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* **124**, 289-294.
- Sánchez, M. C., Llama-Palacios, A., Blanc, V., León, R., Herrera, D. & Sanz, M. (2011) Structure,

viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research* **46**, 252-260.

- Sánchez, M. C., Marín, M. J., Figuero, E., Llama-Palacios, A., León, R., Blanc, V., Herrera, D. & Sanz, M. (2014) Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research* **49**, 20-28.
- Serrano, J., Escribano, M., Roldán, S., Martín, C. & Herrera, D. (2015) Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* **42 Suppl 16**, S106-138.
- Shahzad, M., Millhouse, E., Culshaw, S., Edwards, C. A., Ramage, G. & Combet, E. (2015) Selected dietary (poly)phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. *Food & Function* **6**, 719-729.
- Slots, J. & Rosling, B. G. (1983) Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *Journal of Clinical Periodontology* **10**, 465-486.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28**, 12-55.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**, 135-187.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134-144.
- Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Iwamoto, T. & Kondo, K. (2001) Wine has activity against entero-pathogenic bacteria in vitro but not in vivo. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **65**, 954-957.

- Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B. & Haffajee, A. (2013) Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000* **62**, 95-162.
- Thimothe, J., Bonsi, I. A., Padilla-Zakour, O. I. & Koo, H. (2007) Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific* hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 10200-10207.
- Tonetti, M. S., Chapple, I. L. C. & Working Group 3 of Seventh European Workshop on, P. Biological approaches to the development of novel periodontal therapies--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. In: *Journal of Clinical Periodontology*, Suppl. 1 edition, pp. 114-118. Blackwell Publishing Ltd.
- Toukairin, T., Uchino, K., Iwamoto, M., Murakami, S., Tatebayashi, T., Ogawara, H. & Tonosaki, Y. (1991) New polyphenolic 5'-nucleotidase inhibitors isolated from the wine grape "Koshu" and their biological effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **39**, 1480-1483.
- Tsui, V. W. K., Wong, R. W. K. & Rabie, A. B. M. (2008) The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens in vitro. *Phytotherapy Research : PTR* **22**, 401-406.
- Van der Weijden, G. A. & Timmerman, M. F. (2002) A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **29 Suppl 3**, 55-71- discussion 90-51.
- Van Strydonck, D. A. C., Slot, D. E., Van der Velden, U. & Van der Weijden, F. (2012) Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 1042-1055.
- van Winkelhoff, A. J. (2012) Antibiotics in the treatment of peri-implantitis. *European Journal of Oral Implantology* **5 Suppl**, S43-50.
- White, D. A., Tsakos, G., Pitts, N. B., Fuller, E., Douglas, G. V. A., Murray, J. J. & Steele, J. G. (2012) Adult Dental Health Survey 2009: common oral health conditions and their impact

on the population. *British Dental Journal* **213**, 567-572.

- . Wu, C. D. (2009) Grape products and oral health. *The Journal of Nutrition* **139**, 1818S-1823S.
- . Xie, Q., Li, J. & Zhou, X. (2008) Anticaries effect of compounds extracted from *Galla chinensis* in a multispecies biofilm model. *Oral Microbiology and Immunology* **23**, 459-465.
- . Yamamoto, H. & Ogawa, T. (2002) Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 921-924.
- . Yamanaka, A., Kouchi, T., Kasai, K., Kato, T., Ishihara, K. & Okuda, K. (2007) Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* **42**, 589-592.